Visita le notizie di Nature per le ultime notizie e leggi la dichiarazione di Springer Nature sul conflitto in Ucraina

Articolo | Accesso libero | Pubblicato:15 marzo 2019

DMSO induce cambiamenti drastici nei processi cellulari umani e nel panorama epigenetico *in vitro*

M. Verheijen ,Signor Lienhard ,Y. Schrooders ,O. Clayton ,R. Nudischer ,S.Boerno ,B. Timmermann ,N. Selevsek ,R. Schlapbach ,H. Gmuender ,S. Devo ,J.Geraedts ,R. Herwig ,J. Kleinjans &F. Caimento

Rapporti scientifici **9** , Numero articolo: 4641 (2019)

85k accessi | **84** citazioni | **13** Altmetrico | Metrica

Astratto

Sebbene gli studi clinici per le applicazioni mediche del dimetilsolfossido (DMSO) abbiano riportato tossicità negli anni '60, in seguito la FDA ha classificato il DMSO nella categoria dei solventi più sicuri. Il DMSO è diventato ampiamente utilizzato in molti campi biomedici e gli effetti biologici sono stati trascurati. Nel frattempo, la scienza biomedica si è evoluta verso tecniche sensibili ad alto rendimento e nuove aree di ricerca, tra cui epigenomica e microRNA. Considerando il suo ampio utilizzo, soprattutto per la crioconservazione e *in vitro*test, abbiamo valutato l'effetto biologico del DMSO utilizzando queste innovazioni tecnologiche. Abbiamo esposto microtessuti cardiaci ed epatici 3D su un terreno con o senza 0,1% DMSO e analizzato i profili di trascrittoma, proteoma e metilazione del DNA. In entrambi i tipi di tessuto, l'analisi del trascrittoma ha rilevato > 2000 geni espressi in modo differenziale che influenzano processi biologici simili, indicando così azioni incrociate coerenti del DMSO. Inoltre, l'analisi del microRNA ha rivelato deregolazioni su larga scala dei microRNA cardiaci

ed effetti più piccoli, sebbene ancora massicci, nei microtessuti epatici. Anche i modelli di metilazione dell'intero genoma hanno rivelato la specificità del tessuto. Mentre i microtessuti epatici hanno dimostrato cambiamenti non significativi, i risultati dei microtessuti cardiaci hanno suggerito l'interruzione dei meccanismi di metilazione del DNA che portano a cambiamenti a livello del genoma. I cambiamenti estremi nei microRNA e le alterazioni nel panorama epigenetico indicano che il DMSO non è inerte. Il suo utilizzo dovrebbe essere riconsiderato, soprattutto per la crioconservazione di embrioni e ovociti, poiché può avere un impatto sullo sviluppo embrionale.

Download PDF

Introduction

Dimethyl sulfoxide (DMSO) is an organic polar aprotic molecule with an amphipathic nature that is ideal for dissolving poorly soluble polar and non-polar molecules. DMSO is widely used as solvent in toxicology and pharmacology, for cryopreservation of cells, and as penetration enhancer during topological treatments. The use of DMSO is so obvious that applied concentrations are often unreported. DMSO is generally accepted as nontoxic below 10% (v/v) and, in practice, it is assumed that effects of DMSO are negligible[1,2,3].

Research from the 1960's till 1990's pinpointed a lot of biologically relevant effects of DMSO. It was even actively investigated for medical use, but because of adverse effects especially affecting the eyes, most clinical trials were halted in 1965 by the United States Food and Drug Administration (FDA). At this point in time, DMSO was seen as extremely toxic, comparable to thalidomide[4,5]. The effects of DMSO differ depending on dose and route of administration. Introducing DMSO concentrations higher than 50% into the blood resulted in instant hemolysis, white cell stacking and fibrinogen precipitation while direct injection of DMSO intravenously could cause local irritation and necrosis[6]. LD50 values gained from monkeys indicated that 880

grams applied on the skin or 320 grams injected intravenously would result in 50% mortality in 80 kg humans[7]. This relatively high dose changed the view on DMSO toxicity and the FDA classified DMSO in the same class as ethanol, namely class 3 solvent, which is the safest category with low toxic potential at levels normally accepted in pharmaceuticals[8]. This made the wide use of DMSO possible.

While generally used at relatively low concentrations, DMSO still has medically useful properties such as inducing anti-inflammation, nerve blockage (analgesia), diuretics, vasodilation and muscle relaxation[9]. Furthermore, in cell biology, DMSO is also used as inducer of cell differentiation, free radical scavenger and radioprotectant, but most often for cryopreservation. Cell cultures for research are often stored in liquid nitrogen using slow cooling methodology. To prevent damage by intracellular ice crystals, cells are slowly cooled to −80 degrees in the presence of 10% DMSO before storage in liquid nitrogen[3]. However, this procedure is insufficient for biomedical applications. Because slow cooling still induces damage due to extracellular ice crystals, cryopreservation of human oocytes and embryos for *in vitro* fertilization (IVF) is accomplished by vitrification, in which higher concentrations of cryoprotectants are used to prevent ice formation not only in the cells, but in the entire solution. Higher concentrations are achieved by using mixtures (for example 15% DMSO in combination with 15% ethylene glycol) which reduces the amount and toxicity of the individual cryoprotectants[10]. Furthermore, DMSO readily crosses most tissue membranes of lower animals and man[9]. For example, 2 hours after topological application, DMSO had penetrated all investigated hard and soft tissues (6 and 15 resp.) in rats[11]. DMSO is also able to enhance the permeability of other low molecular weight compounds, thereby making them pass membranes or going deeper into a tissue as they normally would[12], a property highly useful in topological therapies. In 2009, the first to obtain FDA approval for topological DMSO usage was PENNSAID®, which contains diclofenac in a carrier with 45.5% DMSO[13,14]. This relatively high concentration of DMSO in topological applications is necessary because the skin is harder to penetrate than cell membranes.

Most insights into the molecular effects of DMSO were obtained last century often using high doses. In the meantime, biomedical science has evolved towards more

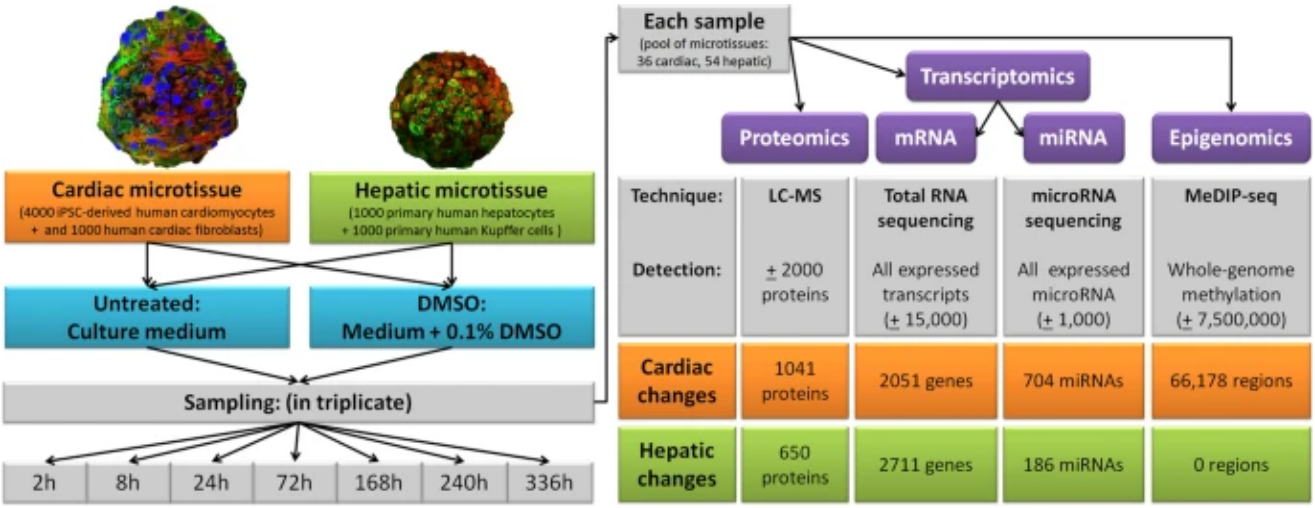
sensitive high-throughput techniques and towards new areas of research, including epigenome modifications and microRNA-mediated gene silencing. Considering its wide use in many biological fields, we analyzed a relatively low dose of DMSO (0.1%, which is commonly applied in cell assays) to study the impact on the proteome, transcriptome and the epigenome. For this, we exposed *in vitro* 3D microtissues (a maturing iPSC-derived cardiac model and a mature hepatic model) to 0.1% DMSO and we collected samples in triplicate at 7 different time points during 2 weeks exposure (2 h, 8 h, 24 h, 72 h, 168 h, 240 h and 336 h). Thereafter, DMSO effects were assessed with full transcriptome analysis (using ribo-depleted total RNA sequencing and microRNA sequencing), whole-genome methylation profiling (using MeDIP-seq) and proteomics analysis (using mass spectrometry). Our analysis clearly demonstrated that DMSO cannot be considered biologically inert but induces large alterations in microRNAs (miRNA) and epigenetic landscape, especially in the maturing cardiac model.

Results

I microtessuti umani 3D (MT) di un modello cardiaco in fase di maturazione e un modello epatico maturo sono stati esposti a terreno di coltura con o senza 0,1% DMSO per due settimane con punti temporali di campionamento a 2, 8, 72, 168, 240 e 336 ore. Il proteoma (circa 2.000 proteine misurate), il trascrittoma completo (compresi i miRNA) e la metilazione dell'intero genoma sono stati misurati su materiale ottenuto dallo stesso campione. Figura 1contiene una panoramica grafica del disegno sperimentale. Per ottenere una prima panoramica degli effetti cross-omici indotti da DMSO, per ciascuna piattaforma vengono riepilogate le quantità di entità modificate in modo differenziale (tutte corrette per test multipli utilizzando FDR <0,05). Il numero di entità variamente modificate differiva tra i tipi di tessuto, con campioni cardiaci che mostravano un effetto maggiore del DMSO rispetto a quello epatico, ad eccezione degli mRNA. Questa differenza è particolarmente evidente per i miRNA e la metilazione del genoma. Poiché i dati proteomici erano meno informativi a causa della loro natura parziale, questi risultati sono stati inclusi nei dati

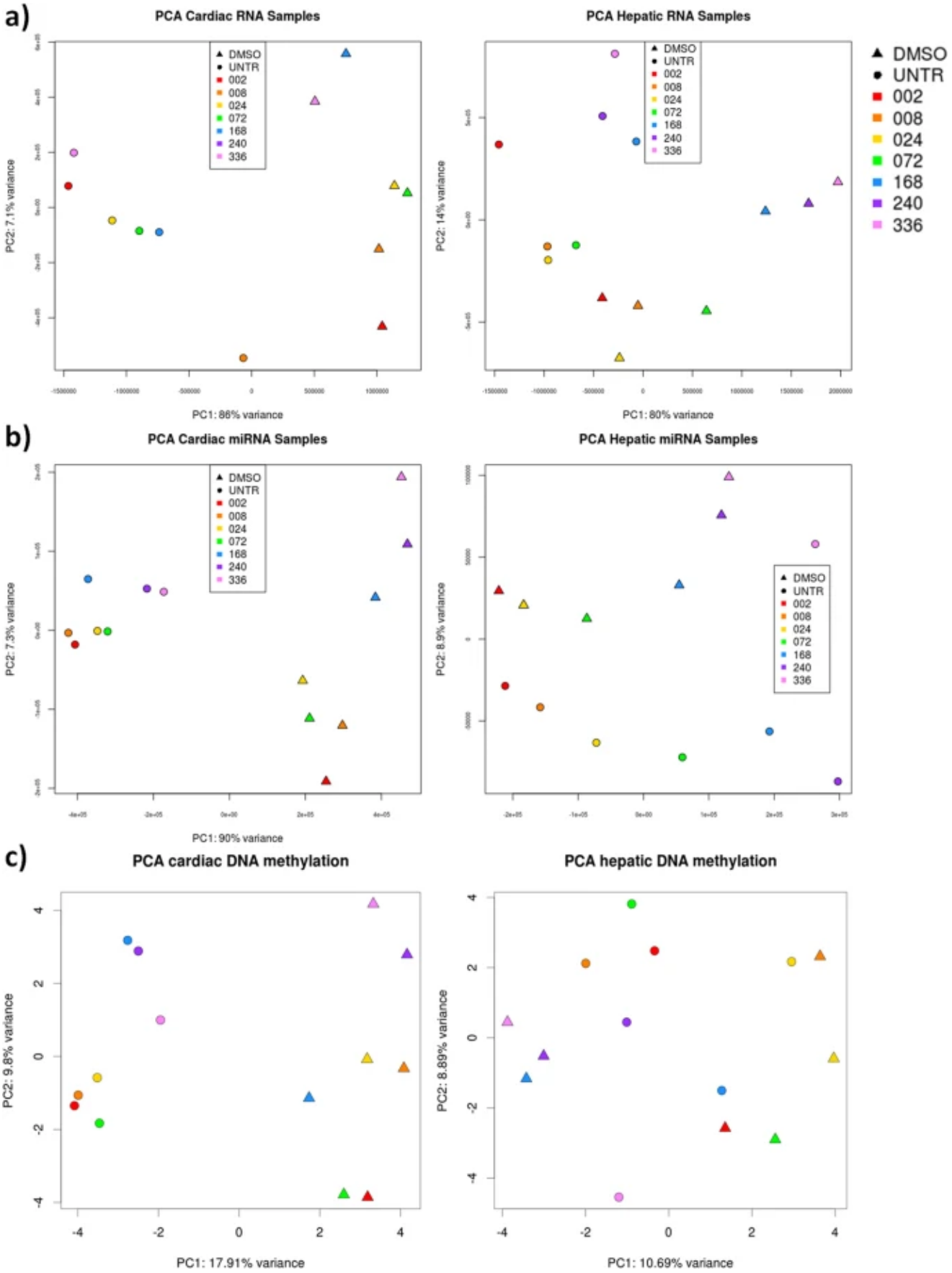
supplementari. Inoltre, l'analisi delle componenti principali (PCA), utilizzando medie di triplicati, per ciascuna piattaforma (Fig. 2& Dati supplementari) illustra chiare differenze tra lo 0,1% di DMSO esposto (DMSO) e i campioni non trattati (UNTR), ad eccezione della metilazione nei MT epatici.

Figura 1



Panoramica grafica del disegno sperimentale combinato con sintesi delle entità differenziali di ciascun metodo di analisi. Le informazioni specifiche del tessuto sono rappresentate in arancione per il cuore e in verde per l'epatico. Inoltre, le esposizioni sono colorate in blu e le piattaforme di misurazione in viola. Abbreviazioni: h = ore; mRNA = RNA messaggero; miRNA = microRNA.

figura 2



PCAs depicting differences between DMSO and UNTR for all measured platforms. (**a**) PCA of RNAs indicates clear differences in RNA expression between DMSO (triangle) and UNTR (circles). Cardiac samples (left) are more distinct from UNTR than hepatic samples (right). (**b**) PCA of miRNAs reveals clear separation between DMSO and UNTR in cardiac samples, while hepatic samples seem more susceptible to the duration of the exposure (as seen by colour

pattern that corresponds to the specific time points, see legend). (**c**) PCA of promotor methylation indicates differences between DMSO and UNTR for cardiac samples but not for hepatic samples.

To study the molecular effects of DMSO, affected cellular processes were analysed using the full transcriptome. Thereafter, tissue-specific effects of DMSO on regulation of gene expression were investigated by analysing changes in miRNAs and genome-methylation.

DMSO effects on cellular processes

DMSO effects on mRNAs were depicted by of PCA (Fig. 2a,b). The clear separation between UNTR and 0.1% DMSO indicated that DMSO was able to affect cellular processes by altering gene expression. Comparison between DMSO and UNTR resulted in 2051 differentially expressed genes (DEGs = FDR <0.05; of which 871 with |log2FC| >1) in cardiac MTs and 2711 DEGs (of which 1879 with |log2FC| >1) in hepatic MTs, of which 60.7% and 62.9% DEGs were downregulated respectively.

Pathway analysis of DEGs

Per identificare i processi cellulari interessati dall'esposizione a DMSO, i DEG sono stati utilizzati per l'analisi della sovrarappresentazione del percorso utilizzando ConsensusPathDB [15] con il database Reactome curato [16] . Percorsi significativamente sovrarappresentati (valore q < 0, 05) sono stati ordinati utilizzando le connessioni gerarchiche tra (sotto) percorsi ottenuti dal browser del percorso del reactome (tabelle supplementari 1 , 2). Un riepilogo contenente i livelli di percorso gerarchico più elevati (d'ora in poi indicati come cluster) è incluso nella Tabella 1 per i MT cardiaci e nella Tabella 2 per i MT epatici.

Tabella 1 Analisi del percorso di DEG e DEP cardiaci rilevati dopo un'esposizione allo 0,1% di DMSO.

Tabella 2 Analisi del percorso di DEG e DEP epatici rilevati dopo un'esposizione allo 0,1% di DMSO.

Attraverso l'analisi del percorso sui DEG, sono stati trovati 225 percorsi significativamente sovrarappresentati (valore q < 0,05) nei MT cardiaci, che corrispondevano a 19 cluster (su un totale di 25 cluster nel Pathway Browser) e 167 percorsi corrispondenti a 16 cluster in MT epatici. C'era una sostanziale sovrapposizione tra i tipi di tessuto, con 60 percorsi e 15 cluster trovati in entrambi. Sebbene vi fossero differenze nell'entità dell'effetto del DMSO tra i tipi di tessuto, i processi biologici interessati dal DMSO non sembrano essere specifici del tessuto.

Il cluster più colpito in modo significativo da DMSO è il cluster "metabolismo" nei MT epatici. Qui, la maggior parte degli effetti sono stati trovati nei percorsi "ciclo dell'acido citrico e trasporto di elettroni respiratori" (valore q: $3,5 * 10^{-10}$, 63 DEG su 171 geni, 76,2% sottoregolato), "metabolismo del glucosio" (valore q: $9,9 * 10^{-9}$, 36 DEG su 77 geni, 80,5% sottoregolato) e "metabolismo di lipidi e lipoproteine" (valore q: $2,9 * 10^{-6}$, 165 DEG su 728 geni, 55,2% sottoregolato). I cambiamenti nel metabolismo dei lipidi e delle lipoproteine non sono stati rilevati nei MT cardiaci utilizzando i DEG, ma sono stati osservati effetti simili del DMSO per "ciclo dell'acido citrico e trasporto degli elettroni respiratori" (valore q: $1,3 * 10^{-12}$, 58 DEG su 171 geni, 65,5% sottoregolato) e "metabolismo del glucosio" (valore q: $2,8 * 10^{-3}$, 20 DEG su 77 geni, 55,0% sottoregolato), sebbene meno geni fossero sottoregolati nei MT cardiaci rispetto a MT epatici.

Un altro cluster altamente colpito dal trattamento con DMSO in entrambi i tipi di tessuto è stato il "trasporto mediato dalle vescicole". Gli effetti del DMSO in questo cluster sono stati rilevati principalmente nei processi relativi al trasporto e alla secrezione di proteine mediate da Golgi. Di questo processo, il "trasporto anterogrado da ER a Golgi" è stato il più colpito (cardiaco: valore q: $2,4 * 10^{-6}$, 38 DEG su 134 geni, 68,4% sottoregolato; epatico: valore q: $1,0 * 10^{-5}$, 44 DEG su 134 geni, il 44,4% sottoregolato). Questo percorso faceva anche parte del cluster "metabolismo delle proteine", che ha inoltre rivelato gli effetti del DMSO sulla "glicosilazione N-linked

dell'asparagina" (Cardiaco: valore q: 2,1 * 10^{-6} , 64 DEG su 283 geni, 76,6% sottoregolato ; Epatico: valore q: 1,2 * 10^{-7}, 83 DEG su 283 geni, il 54,8% sottoregolato), che erano modificazioni proteiche post-trascrizionali necessarie per il trasporto di proteine dall'ER al Golgi [17] .

Sebbene il cluster di "risposte cellulari allo stress" sia stato rilevato in entrambi i tipi di tessuto, i percorsi sovrarappresentati differiscono. La "senescenza cellulare" è stata significativamente influenzata nei MT cardiaci (valore q: 2,6 * 10^{-4} , dimensione del percorso: 192, 42 DEG, 64,3% sottoregolato), ma non rilevata durante l'analisi del percorso nei MT epatici. Infine, ulteriori cluster specifici cardiaci affetti da DMSO erano "ciclo cellulare", "riparazione del DNA", "biogenesi e mantenimento degli organelli", ma anche il cluster altamente significativo (q <0,01) di "organizzazione della cromatina". Poiché i percorsi più colpiti sono stati trovati in entrambi i tipi di tessuto, ciò indica azioni robuste del DMSO.

Effetti del DMSO osservati nella regolazione dell'espressione e della traduzione genica

I percorsi correlati alla regolazione dell'espressione e della traduzione genica sono stati già rilevati durante l'analisi del percorso dei MT cardiaci (Tabella 3). Sebbene questi percorsi non fossero sovrarappresentati nei MT epatici, le quantità di DEG rilevate indicavano che il DMSO era in grado di influenzare questi processi e poteva indurre alterazioni biologiche al modello cellulare.

Tabella 3 Percorsi relativi alla regolazione trascrizionale.

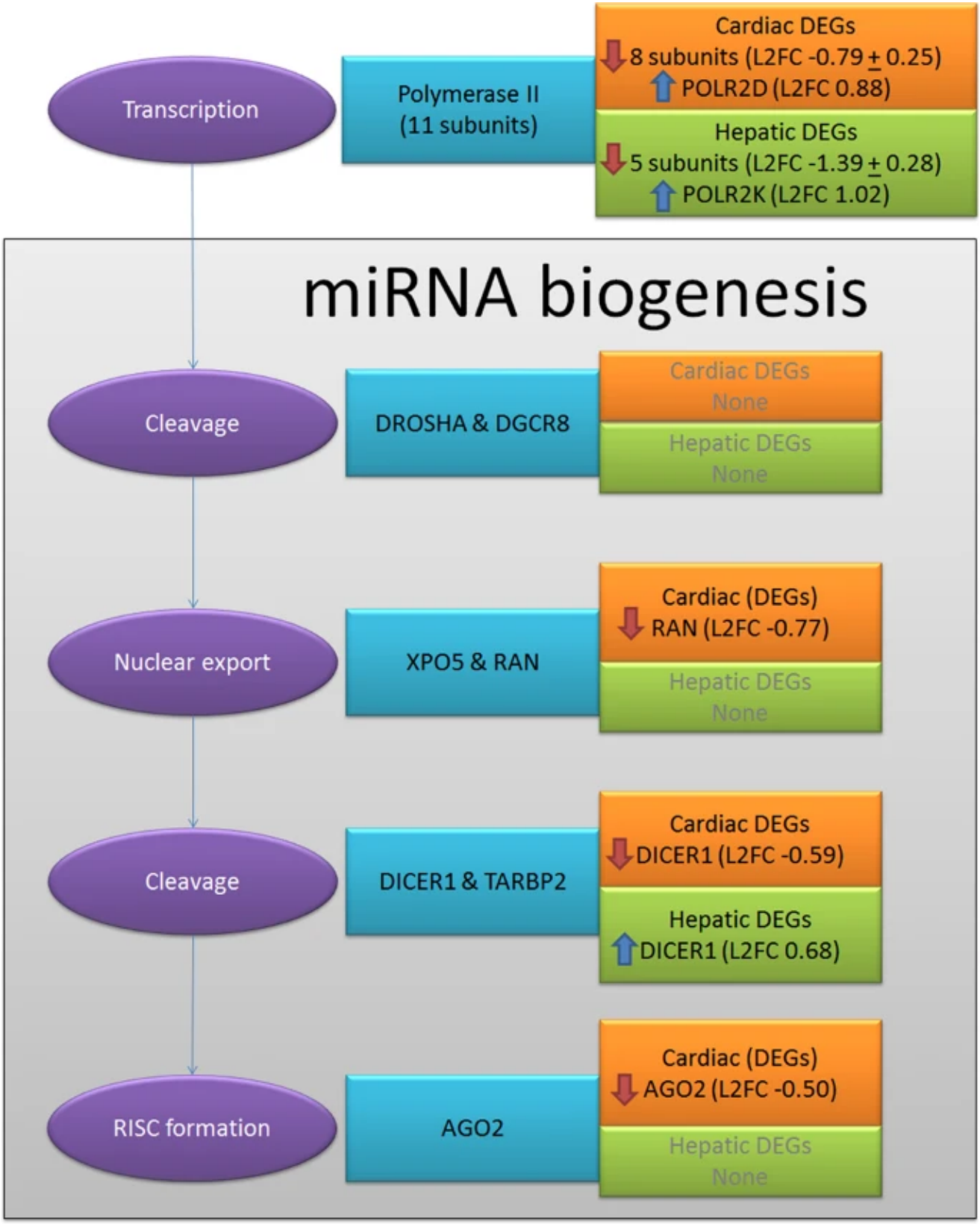
Effetti DMSO osservati nella regolazione dai microRNA

L'influenza tissutale del DMSO è stata osservata nei dati di sequenziamento dei miRNA. Su 1.105 miRNA cardiaci sequenziati, 704 (= 63,7%) erano espressi in modo differenziale (DE, FDR <0,05) con il 59,5% che mostrava una downregulation. Inoltre, il grafico PCA (Fig. 2c) ha rivelato una chiara differenza tra i miRNA dei gruppi di trattamento. Nelle MT epatiche, su 1.033 miRNA sequenziati, 186 (= 18%) erano DE con circa la metà dei miRNA sovraregolati (47,3%). Inoltre, il grafico PCA non solo ha rivelato una chiara separazione tra i miRNA dei gruppi di trattamento, ma ha indicato

anche un effetto dipendente dal tempo. Le due componenti principali (tempo e dose) rappresentavano insieme più del 95% della variazione totale, lasciando solo un effetto minore per altri fattori.

Per studiare la fonte della differenza tessuto-specifica, i cambiamenti dell'espressione genica nel processo di biogenesi del miRNA sono stati studiati in modo più dettagliato (Fig. 3). La biogenesi del miRNA inizia con la trascrizione del miRNA primario trascritto dalla polimerasi II (un complesso di 11 subunità) o dalla polimerasi III (un complesso di 10 subunità). Nelle MT cardiache, la polimerasi II conteneva 1 geni sovraregolati e 8 sottoregolati. Nelle MT epatiche, 5 geni erano sottoregolati e 1 sovraregolato. Sebbene un minor numero di geni fosse sottoregolato nei MT epatici, i cambiamenti di piega erano maggiori rispetto ai MT cardiaci. La scissione del pri-miRNA in pre-miRNA non sembrava influenzata dall'esposizione al DMSO. *DICER1*(che scinde i pre-miRNA) è stato sottoregolato nei MT cardiaci e sovraregolato nei MT epatici, descrivendo una chiara differenza specifica del tessuto nella risposta all'esposizione al DMSO. Infine, *AGO2* (che codifica per il componente principale del miRNA-RISC) è stato sottoregolato nei MT cardiaci. I cambiamenti in questo processo potrebbero indurre differenze nel contenuto di miRNA delle cellule e quindi influenzare la loro funzione di regolazione.

Figura 3



Effetto DMSO nel processo di silenziamento genico da parte degli RNA. DEG nella biogenesi del miRNA. Il processo completo è suddiviso in sottoprocessi (ovali viola) e raffiguranti geni coinvolti (rettangoli blu) e DEG rilevati per campioni cardiaci (rettangoli arancioni) ed epatici (rettangoli verdi).

Nelle MT cardiache, i geni sottoregolati nella biogenesi dei miRNA potrebbero spiegare la quantità estremamente elevata di miRNA DE sottoregolato e indicare un'estrema deregolazione del silenziamento genico da parte dei miRNA. Nelle MT epatiche, dove l'unico cambiamento significativo era la sovraregolazione di *DICER1* (Tabella 3), la biogenesi del miRNA non è stata interrotta dall'esposizione al DMSO.

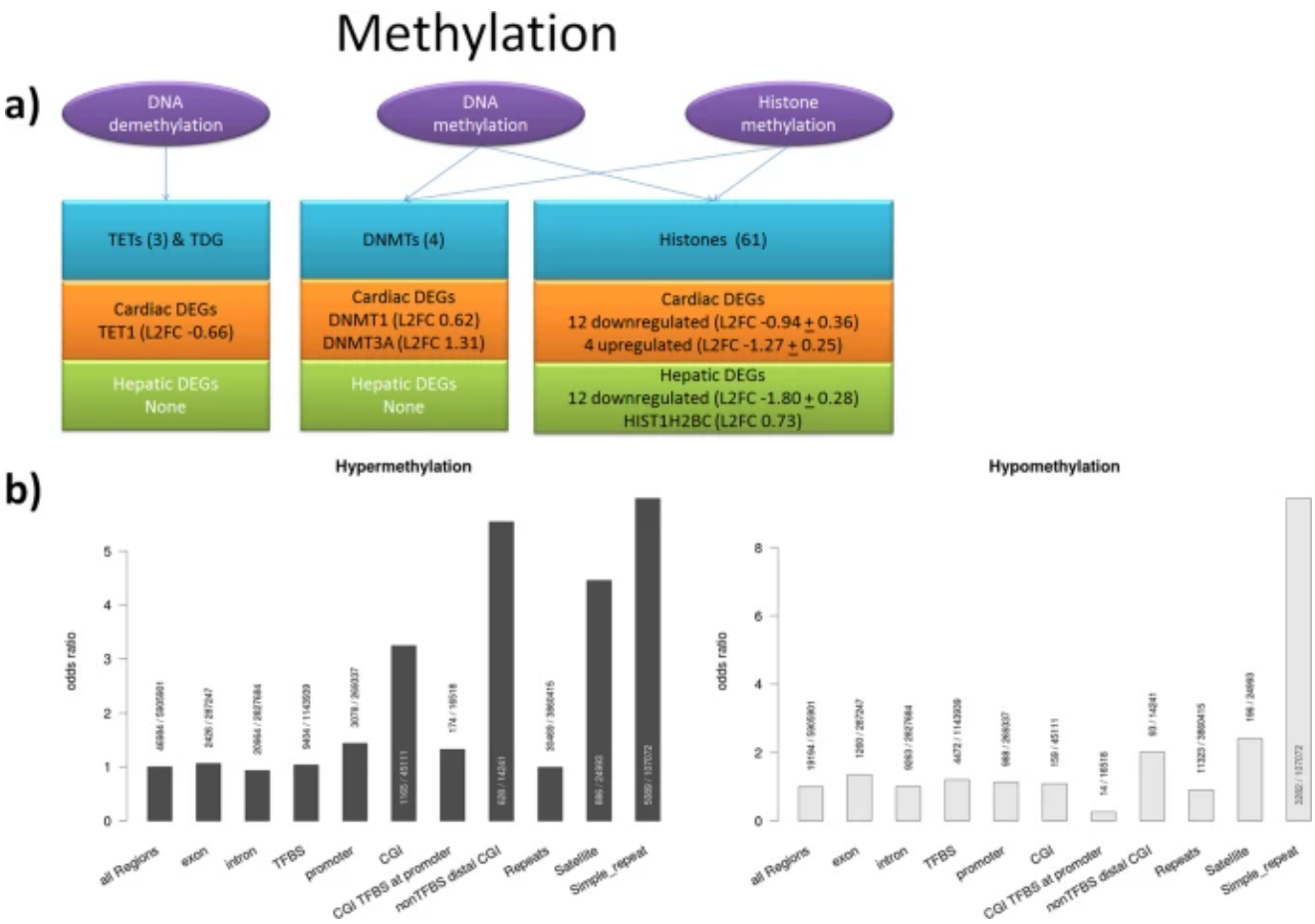
Per ottenere un'indicazione degli effetti del DMSO sul silenziamento genico da parte dei miRNA, il database miRTarBase [18] , contenente interazioni microRNA-target (MTI) convalidate sperimentalmente, è stato utilizzato per ottenere bersagli genici dei miRNA DE rilevati. Abbiamo incluso solo MTI con prove evidenti (convalidate da reporter assay, Western blot o qPCR). Dei 704 miRNA cardiaci DE, solo 281 (= 40%) sono stati trovati nel database, risultando in un totale di 2051 bersagli genici potenzialmente interessati dai cambiamenti indotti da DMSO nel silenziamento genico del miRNA. Per le MT epatiche, sono stati ottenuti target per 106 DE miRNA (= 57%), con un totale di 545 geni potenzialmente interessati. I bersagli genici ottenuti sono stati utilizzati per visualizzare i percorsi sovrarappresentati utilizzando il browser del percorso del reactome (Figura 3 supplementare). Inaspettatamente, i percorsi sovrarappresentati si trovavano negli stessi cluster per entrambi i tipi di tessuto. La maggior parte degli effetti è stata osservata per "Trasduzione del segnale", "Sistema immunitario" ed "Espressione genica". Tuttavia, l'estrema deregolamentazione degli MT cardiaci e le informazioni limitate sugli MTI stanno rendendo irrilevante qualsiasi analisi a valle sull'mRNA presunto interessato.

Effetti DMSO osservati in epigenetica

Al fine di valutare le alterazioni epigenetiche introdotte da DMSO, ci concentriamo sulla metilazione del DNA dell'intero genoma. L'analisi del percorso dell'espressione genica cardiaca ha rivelato la deregolamentazione dei percorsi di metilazione del DNA. Le metiltransferasi *DNMT1* , un fattore chiave per il mantenimento della metilazione del DNA, e *DNMT3A* , che facilitano sia il *de novo* che il mantenimento della metilazione del DNA, sono state sovraregolate mentre *TET1* , che svolge un ruolo chiave nella demetilazione attiva, è stata sottoregolata nelle MT cardiache (Fig. 4a). La sovraregolazione degli scrittori epigenetici e la sottoregolazione delle gomme dopo il trattamento con DMSO hanno indicato l'ipermetilazione genomica, che

potenzialmente ha ridotto l'attività trascrizionale. Al contrario, nell'analisi della via epatica, non è stata osservata la deregolazione della metilazione del DNA. Si noti che, in entrambi i tipi di tessuto, sono state osservate prove trascrizionali per la deregolazione di altri meccanismi epigenetici correlati, come la metilazione dell'istone, in cui 16 geni e 13 geni erano espressi in modo differenziale rispettivamente nei MT cardiaci ed epatici.

Figura 4



Regolazione epigenetica dell'espressione genica. (**a**) DEG coinvolti nella metilazione del DNA. Il processo è suddiviso in sottoprocessi (ovali viola) e raffiguranti geni coinvolti (rettangoli blu) e DEG rilevati per campioni cardiaci (rettangoli arancioni) ed epatici (rettangoli verdi). (**b**) Arricchimento relativo dei DMR (DMSO vs UNTR, FDR 5%) all'interno delle caratteristiche genomiche. Per ciascuna funzione viene rappresentato il numero di DMR sovrapposti rispetto al numero totale di finestre testate per la rispettiva funzione. Rispetto a tutte le regioni genomiche, le regioni ipermetilate sono arricchite per satelliti, ripetizioni semplici e CGI distali ai promotori senza prove normative note e le regioni ipometilate sono arricchite per ripetizioni semplici.

Il profilo della metilazione dell'intero genoma mediante MeDIP-seq ha rivelato 66.178 regioni differenzialmente metilate (DMR; valore q <0,05) in MT cardiaci. Queste alterazioni hanno interessato l'1,1% del genoma coperto. In linea con i cambiamenti trascrizionali osservati di scrittori e cancellatori della metilazione del DNA, il 71% dei DMR corrispondeva al guadagno di metilazione (46.984 regioni ipermetilate contro 19.194 regioni ipometilate). Al contrario, nei MT epatici, nessun DMR ha superato la correzione per test multipli. Inoltre, il grafico PCA (Fig. 2d) ha indicato una differenza tra i gruppi di trattamento nei MT cardiaci ma non nei MT epatici. Insieme, questo ha illustrato l'impatto specifico del tessuto del DMSO sul metiloma nella maturazione dei MT cardiaci, mentre i MT epatici maturi non sono apparsi inalterati.

Al fine di analizzare gli effetti regolatori dei DMR, le regioni sono state annotate con caratteristiche normative note, come promotori, isole CpG (CGI), siti di legame del fattore di trascrizione (TFBS) e diverse classi di elementi ripetitivi (Fig. 4b). Sia le regioni ipo che quelle ipermetilate hanno arricchito classi di ripetizioni specifiche come i satelliti (odds ratio di iper/ipometilazione: 4,4/2,4) e le ripetizioni semplici (iper/ipometilazione 6,0/9,4 odds ratio), mentre gli elementi ripetitivi in generale non sono stati arricchiti. L'effetto del DMSO sulla sovraregolazione dei DNMT e la successiva ipermetilazione delle sequenze ripetute era in linea con i risultati precedenti nei corpi embrionali di topo [19]. Come previsto, anche le regioni ipermetilate erano altamente arricchite in CGI senza prove normative, ad esempio non sovrapposte con TFBS e distali ai siti di inizio della trascrizione. L'odds ratio di queste regioni sul genoma era 5,5. Mentre le CGI in generale avevano un odds ratio di 3,2, non c'era arricchimento di CGI che si sovrapponevano a TFBS noti presso i promotori, le regioni con il potenziale normativo meglio studiato. Proprio come le regioni del promotore, altre caratteristiche come esoni, introni e TFBS sono state influenzate dall'ipermetilazione all'incirca alle quote del background genomico catturato (Fig. 4b). Sebbene abbiamo trovato esempi specifici in cui l'ipermetilazione del promotore si verifica in concomitanza con la repressione trascrizionale, non è stata osservata alcuna correlazione globale tra la metilazione differenziale del promotore e l'espressione genica. Solo 148 dei 1.436 geni (10,3%) con promotori ipermetilati erano sottoregolati nei MT cardiaci trattati con DMSO. 86 dei geni (6%) erano sovraespressi, contrariamente all'effetto repressivo previsto della metilazione.

Presi insieme, i nostri dati implicavano un'influenza fondamentale del DMSO sulla metilazione del DNA nei MT cardiaci, ma non nei MT epatici. Le alterazioni indotte hanno interessato preferenzialmente i satelliti e le ripetizioni semplici, nonché i CGI distali rispetto ai promotori senza prove normative note. L'espressione dei geni vicini non era significativamente correlata alle differenze di metilazione. Concludiamo quindi che la repressione trascrizionale da parte dell'ipermetilazione del promotore non era l'effetto regolatorio primario dei segni di metilazione alterati, ma i risultati indicano un'interruzione globale dei meccanismi di metilazione del DNA.

Discussione

Mentre alte dosi di DMSO sono state inizialmente studiate per applicazioni mediche, dosi più basse sono ora comunemente usate come solventi per la tossicologia o per la crioconservazione di colture cellulari, ovociti ed embrioni. Nel frattempo, gli effetti biologici del DMSO sono stati dimenticati o considerati trascurabili. Con l'evoluzione della scienza biomedica verso tecniche ad alto rendimento più sensibili e verso nuove aree di ricerca, comprese le modifiche dell'epigenoma e il silenziamento genico mediato da microRNA, abbiamo valutato gli effetti biologici dell'esposizione al DMSO sul trascrittoma e sull'epigenoma.

La prima panoramica degli effetti cross-omici indotti da DMSO, osservati attraverso quantità di entità differenzialmente modificate e analisi PCA, ha indicato una maggiore suscettibilità agli effetti DMSO nei MT cardiaci. Le differenze tra i tipi di tessuto studiati possono riguardare il fatto che il modello cardiaco contiene cardiomiociti umani derivati da iPSC che stanno ancora maturando, mentre il modello epatico contiene epatociti umani maturi. Attualmente, non è ancora possibile che le cellule iPSC raggiungano un fenotipo simile all'adulto [20, 21] e la rassegna concisa sui cardiomiociti umani derivati da iPSC di Robertson *et al* . [22]descrive le iPSC per assomigliare meglio ai cardiomiociti fetali (per quanto riguarda la struttura, la proliferazione, il metabolismo e l'elettrofisiologia) piuttosto che i cardiomiociti adulti. Le nostre osservazioni sugli effetti del DMSO, in particolare le modificazioni epigenetiche estreme nelle cellule cardiache simili a quelle fetali, sono particolarmente

rilevanti per la crioconservazione durante la tecnologia di riproduzione assistita (embrioni, ovociti e spermatozoi). Un'altra differenza da considerare tra i nostri due modelli cellulari è il numero di donatori. Infatti, mentre i MT cardiaci sono composti da cardiomiociti derivati da IPSC da un singolo donatore (co-coltivati con fibroblasti anche da 1 donatore), i MT epatici contengono epatociti maturi da 10 donatori (co-coltivati con cellule di Kupffer di 1 donatore). Mentre un modello a donatore singolo è più paragonabile a uno *in vivo*situazione quindi un modello multi-donatore, i MT cardiaci a donatore singolo potrebbero essere più suscettibili a bias a causa della sensibilità del genotipo rispetto ai nostri MT epatici multi-donatore che hanno la capacità di uniformare questi effetti.

Gli effetti del DMSO sui processi cellulari sono stati analizzati utilizzando i dati completi del trascrittoma. Sono stati identificati 2.051 DEG per MT cardiaci e 2711 DEG per MT epatici. In entrambi i tipi di tessuto, si riscontrano sottoregolazioni per il 60% dei DEG. L'analisi della sovrarappresentazione del percorso mediante DEG, evidenzia effetti DMSO simili in entrambi i tipi di tessuto. Ciò indica azioni robuste di DMSO che potrebbero essere estrapolate ad altri tessuti. I cambiamenti osservati nei processi cellulari includono cambiamenti nelle vie mitocondriali legate alla produzione di ROS e alla generazione di ATP cellulare. DMSO è un noto scavenger di radicali [23] . Sebbene questa proprietà del DMSO possa fornire protezione contro alti livelli di ROS, a livelli normali o ridotti di ROS, può ostacolare il metabolismo delle cellule basali assorbendo gli elettroni necessari per la produzione di ATP [24]. La conseguente diminuzione del contenuto di ATP è stata osservata nei nostri due modelli cellulari trattati con DMSO (Figura 2 supplementare). I MT cardiaci hanno mostrato una forte diminuzione nel tempo (diminuzione dell'87% dopo 2 settimane di esposizione), mentre il contenuto di ATP dei MT epatici mostra inizialmente una piccola diminuzione (diminuzione del 36% nelle prime 72 ore), dopodiché il contenuto di ATP è lentamente recuperato al valore basale livello. Diversi effetti a valle sono rilevanti a seconda dell'applicazione biologica del DMSO. Ad esempio, per i saggi cellulari e la ricerca tossicologica, i cambiamenti nella quantità di ROS o di energia libera nella cellula influiscono sulla capacità della cellula di affrontare gli stress indotti, portando così potenzialmente a un'interpretazione errata dei risultati *in vitro*saggi. All'interno della tecnologia di riproduzione assistita, il contenuto di ATP è un buon predittore

della vitalità dell'embrione. La diminuzione dell'ATP indotta da DMSO, specialmente nella fase di scissione, può indurre effetti a valle che possono interrompere la funzione cellulare, la capacità di impianto e lo sviluppo fetale [25, 26]. La riduzione indotta da DMSO dei tassi di impianto e le perdite di gravidanza erano già state osservate da modelli animali [27].

Oltre a sovrapporsi nei processi interessati dal DMSO tra i tipi di tessuto, l'analisi del percorso ha anche rivelato differenze tessuto-specifiche. La maggiore quantità di processi interessati rilevati nei MT cardiaci può indicare una maggiore suscettibilità dei MT cardiaci agli effetti del DMSO, sebbene potrebbe esserci anche un pregiudizio statistico dovuto alla diversa quantità di DEG utilizzati nell'analisi del percorso. La differenza più significativa è il rilevamento dell '"organizzazione della cromatina" nei MT cardiaci, mentre questo cluster non è osservato nei MT epatici. I MT cardiaci mostrano anche più effetti in altri processi che regolano l'espressione genica. I risultati dell'analisi dei miRNA hanno rivelato la completa deregolamentazione della biogenesi dei miRNA cardiaci e del contenuto di miRNA. Sebbene i cambiamenti nella biogenesi dei miRNA epatici fossero minimi, ancora il 18% dei miRNA rilevati è stato significativamente modificato dall'esposizione al DMSO. Gli effetti di metilazione dell'intero genoma sul trattamento con DMSO mostrano un'ampia variazione tessuto-specifica. Sebbene non vi siano differenze significative rispetto ai MT epatici, si osservano forti effetti con i MT cardiaci, in particolare rispetto a sequenze ripetitive specifiche come satelliti e ripetizioni semplici. Gli elementi ripetitivi del DNA rappresentano il 50% del genoma umano e la metilazione in queste regioni sopprime la loro mobilità e mantiene la stabilità genomica. I cambiamenti nello stato di metilazione delle ripetizioni dopo il trattamento con DMSO potrebbero destabilizzare il genoma, implicando conseguenze fenotipiche e patologiche. Infatti, recentemente, sono state riscontrate variazioni di metilazione di sequenze ripetitive, in particolare elementi di ripetizione satellite, nel tessuto cardiaco cardiomiopatico rispetto al normale tessuto cardiaco Sebbene non vi siano differenze significative rispetto ai MT epatici, si osservano forti effetti con i MT cardiaci, in particolare rispetto a sequenze ripetitive specifiche come satelliti e ripetizioni semplici. Gli elementi ripetitivi del DNA rappresentano il 50% del genoma umano e la metilazione in queste regioni sopprime la loro mobilità e mantiene la stabilità genomica. I cambiamenti nello stato di

metilazione delle ripetizioni dopo il trattamento con DMSO potrebbero destabilizzare il genoma, implicando conseguenze fenotipiche e patologiche. Infatti, recentemente, sono state riscontrate variazioni di metilazione di sequenze ripetitive, in particolare elementi di ripetizione satellite, nel tessuto cardiaco cardiomiopatico rispetto al normale tessuto cardiaco Sebbene non vi siano differenze significative rispetto ai MT epatici, si osservano forti effetti con i MT cardiaci, in particolare rispetto a sequenze ripetitive specifiche come satelliti e ripetizioni semplici. Gli elementi ripetitivi del DNA rappresentano il 50% del genoma umano e la metilazione in queste regioni sopprime la loro mobilità e mantiene la stabilità genomica. I cambiamenti nello stato di metilazione delle ripetizioni dopo il trattamento con DMSO potrebbero destabilizzare il genoma, implicando conseguenze fenotipiche e patologiche. Infatti, recentemente, sono state riscontrate variazioni di metilazione di sequenze ripetitive, in particolare elementi di ripetizione satellite, nel tessuto cardiaco cardiomiopatico rispetto al normale tessuto cardiaco in particolare rispetto a specifiche sequenze ripetitive come satelliti e ripetizioni semplici. Gli elementi ripetitivi del DNA rappresentano il 50% del genoma umano e la metilazione in queste regioni sopprime la loro mobilità e mantiene la stabilità genomica. I cambiamenti nello stato di metilazione delle ripetizioni dopo il trattamento con DMSO potrebbero destabilizzare il genoma, implicando conseguenze fenotipiche e patologiche. Infatti, recentemente, sono state riscontrate variazioni di metilazione di sequenze ripetitive, in particolare elementi di ripetizione satellite, nel tessuto cardiaco cardiomiopatico rispetto al normale tessuto cardiaco in particolare rispetto a specifiche sequenze ripetitive come satelliti e ripetizioni semplici. Gli elementi ripetitivi del DNA rappresentano il 50% del genoma umano e la metilazione in queste regioni sopprime la loro mobilità e mantiene la stabilità genomica. I cambiamenti nello stato di metilazione delle ripetizioni dopo il trattamento con DMSO potrebbero destabilizzare il genoma, implicando conseguenze fenotipiche e patologiche. Infatti, recentemente, sono state riscontrate variazioni di metilazione di sequenze ripetitive, in particolare elementi di ripetizione satellite, nel tessuto cardiaco cardiomiopatico rispetto al normale tessuto cardiaco I cambiamenti nello stato di metilazione delle ripetizioni dopo il trattamento con DMSO potrebbero destabilizzare il genoma, implicando conseguenze fenotipiche e patologiche. Infatti, recentemente, sono state riscontrate variazioni di metilazione di sequenze ripetitive, in particolare elementi di ripetizione satellite, nel tessuto cardiaco cardiomiopatico

rispetto al normale tessuto cardiaco I cambiamenti nello stato di metilazione delle ripetizioni dopo il trattamento con DMSO potrebbero destabilizzare il genoma, implicando conseguenze fenotipiche e patologiche. Infatti, recentemente, sono state riscontrate variazioni di metilazione di sequenze ripetitive, in particolare elementi di ripetizione satellite, nel tessuto cardiaco cardiomiopatico rispetto al normale tessuto cardiaco[28] . Inoltre, è stato dimostrato che il DMSO modifica i profili di metilazione del DNA dell'intero genoma in base a specifici loci genici. Ciò potrebbe essere dovuto alla drastica stimolazione di *DNMT1* e *DNMT3* . Abbiamo osservato la sovraregolazione dei *DNMT* , ma la letteratura ha anche riportato un aumento dei livelli proteici e dell'attività catalitica dall'interazione del DMSO con i loro substrati enzimatici (DNA e AdoMet) [19 , 29 , 30] . Inoltre, è anche possibile che il DMSO agisca come un donatore di metile per indurre l'ipermetilazione [31]. Tuttavia, va tenuto presente che esiste un'interazione tra la metilazione del DNA e la configurazione della cromatina, che è regolata da più processi rispetto ai soli DNMT. Nel complesso, ipotizziamo che gli effetti del DMSO sui cambiamenti della metilazione siano una deregolamentazione globale caratterizzata da un'ipermetilazione dell'intero genoma. I meccanismi cellulari incaricati di rimuovere le metilazioni dannose in regioni importanti, come TFBS, potrebbero quindi aver rimosso i cambiamenti di metilazione con un esito negativo sulla sopravvivenza cellulare, lasciando una sovrarappresentazione del DMR negli elementi ripetitivi. Questo è in analogia con i tassi di mutazione, che sono più elevati per gli elementi ripetitivi poiché sono meno soggetti alla selezione naturale e ai meccanismi di riparazione del DNA [32]. Riteniamo che la differenza di metilazione tra cellule epatiche mature e cellule cardiache in maturazione possa essere dannosa per le cellule crioconservate e in particolare per ovociti ed embrioni. Gli effetti DMSO precedentemente riportati su ovociti ed embrioni sono limitati ai cambiamenti nell'espressione genica nei modelli animali [27 , 33 , 34 , 35 , 36] . Abbiamo ora mostrato, per la prima volta, l'influenza del DMSO sull'epigenoma delle cellule umane *in vitro* . Non è chiaro se le cellule esposte possano riprendersi da esposizioni temporanee a DMSO. È stata documentata una maggiore sopravvivenza per gli embrioni dopo il ritiro dal DMSO al 2% per meno di 24 ore, sebbene questo non fosse il caso con esposizioni più lunghe di 48 ore [27]. Sebbene i cambiamenti di metilazione abbiano una natura adattiva, possono anche essere persistenti. Dalla ricerca condotta sulla coorte olandese della carestia, è noto che il periodo periconcezionale (prima del

concepimento fino all'inizio della gravidanza) è cruciale per stabilire e mantenere segni epigenetici. Durante questo periodo i segni epigenetici presenti sul DNA parentale vengono rimossi per produrre uno zigote totipotente che viene riprogrammato dopo l'impianto [37] . Le esposizioni durante questo periodo possono indurre differenze epigenetiche persistenti, che possono provocare malattie più tardi nella vita o eventualmente essere ereditate dalla prole per indurre effetti transgenerazionali [38, 39, 40, 41, 42]. È già noto che i bambini concepiti attraverso le tecnologie di riproduzione assistita tendono a nascere pretermine, hanno un basso peso alla nascita e hanno anche un rischio significativamente maggiore di difetti alla nascita [43, 44] . Inoltre, alcuni esiti di salute a breve termine sono stati leggermente inferiori nei bambini concepiti con la fecondazione in vitro, sebbene nel complesso i risultati siano stati positivi [42, 45] . Per quanto riguarda la salute e lo sviluppo a lungo termine, sebbene i dati disponibili siano limitati, sono stati indicati i fattori di rischio cardiovascolare e metabolico che alla fine possono sfociare in malattie cardiometaboliche croniche [42]. Inoltre, sono stati dibattuti anche i rischi epigenetici, concentrandosi principalmente sulla metilazione e sull'imprinting. Per i disturbi dell'imprinting più studiati, la sindrome di Beck-with-Wiedemann e la sindrome di Angelman, l'incidenza era maggiore per i bambini nati dopo le tecnologie di riproduzione assistita rispetto al concepimento naturale [41, 46, 47, 48, 49, 50] . Sebbene ci siano molti fattori che contribuiscono a queste anomalie (diminuzione dell'infertilità, età più elevata dei genitori, interferenza tecnica con un processo biologico, ecc.) Gli effetti indotti dal DMSO possono essere uno di questi.

Nell'ultimo decennio, i miglioramenti apportati alla tecnologia riproduttiva artificiale hanno notevolmente aumentato il tasso di successo dei trattamenti di fecondazione in vitro. In particolare, le migliori tecniche di crioconservazione (transizione alla vetrificazione) hanno aiutato notevolmente. Sebbene non sia stato ancora dimostrato, vengono riportati tassi di successo aumentati quando si impiantano embrioni precedentemente congelati [51, 52, 53] . Ciò ha indotto la tendenza del "congela tutto" nella clinica, che aumenta notevolmente la necessità di comprendere le conseguenze della crioconservazione a livello molecolare. Inoltre, mentre la conservazione degli ovociti congelati era inizialmente destinata alle donne minacciate dalla diminuzione della fertilità dovuta a malattie, nella nostra società incentrata sui portatori, è

diventata anche un metodo per prevenire l'infertilità legata all'età per le donne che vogliono ritardare la maternità [54]. Lo sviluppo più recente nella tecnologia di riproduzione assistita è l'emergere di preoccupazioni sugli effetti DMSO. Sebbene ci siano ancora controversie su questo argomento, il campo si sta muovendo verso metodi privi di DMSO. Tuttavia, privo di DMSO non significa automaticamente sicuro a causa dell'uso di altri crioprotettori [55, 56, 57].

Conclusioni

Il nostro studio mette in evidenza la capacità del DMSO di indurre cambiamenti nei processi cellulari sia nelle cellule cardiache che epatiche, ma più gravemente, indurre alterazioni nel miRNA e nel panorama epigenetico nel modello cardiaco in maturazione 3D. I cambiamenti nei processi cellulari possono avere conseguenze per le conclusioni tratte dai saggi cellulari e quindi anche in qualsiasi applicazione di questi risultati (ad es. conclusioni false negative sulla tossicità dei farmaci). Inoltre, i cambiamenti estremi nei miRNA e le alterazioni del panorama epigenetico possono rappresentare una minaccia, soprattutto per la tecnologia di riproduzione assistita. L'ipermetilazione dell'intero genoma indotta dalla deregolamentazione globale dei meccanismi di metilazione, specialmente quando colpisce geni importanti nello sviluppo, può avere conseguenze negative direttamente, più avanti nella vita o forse nelle generazioni successive.

Nel complesso, l'uso di DMSO dovrebbe essere evitato ove possibile. Tuttavia, per il momento, il DMSO è indispensabile nelle applicazioni biotecnologiche. In questi casi, dovrebbero essere considerati gli effetti che il DMSO può avere e la concentrazione dovrebbe essere mantenuta il più bassa possibile, perché anche a basse concentrazioni il DMSO non è inerte.

Metodi

Campioni

In questo studio sono stati utilizzati microtessuti cardiaci umani 3D InSight ™ (InSphero, per beta-tester), contenenti una co-coltura di circa 4000 cardiomiociti umani derivati da iPSC da una donatrice caucasica senza fenotipo di malattia noto e 1000 fibroblasti cardiaci da un Maschio caucasico di 18 anni. Le MT sono state coltivate in 3D Insight ™ Human Cardiac Microtissue Maintenance Medium (InSphero). Inoltre, sono stati utilizzati 3D InSight ™ Human Liver Microtissues (InSphero), circa 1000 epatociti umani primari (pool multi-donatore di 5 maschi e 5 femmine di età compresa tra 7 e 59 anni) in co-coltura con 1000 cellule di Kupffer umane primarie da un caucasico 27 anni di sesso non dichiarato. Le MT sono state coltivate in 3D Insight ™Mezzo di mantenimento del microtessuto del fegato umano - AF (InSphero).

Esposizione

I microtessuti (MT) sono stati esposti solo al mezzo (= non trattato) o al mezzo contenente lo 0,1% di DMSO per due settimane. Il mezzo è stato cambiato tre volte al giorno, in accordo con il disegno sperimentale della nostra attuale ricerca [58] . Durante l'esposizione di 2 settimane, ci sono stati un totale di 7 punti temporali di campionamento a 2, 8, 24, 72, 168, 240 e 336 ore, che sono stati campionati in triplicato (totale 21 campioni per condizione). Per campione, sono stati utilizzati 36 MT cardiaci o 54 MT epatici per ottenere quantità sufficienti di RNA per il sequenziamento.

Preparazione del campione di sequenziamento dell'RNA

L'RNA totale è stato isolato utilizzando il kit universale AllPrep DNA/RNA/miRNA (Qiagen). Il campione è stato impoverito di RNA ribosomiale utilizzando il kit di rimozione dell'rRNA Ribo-Zero Gold (umano/topo/ratto) (Illumina®) e preparato per il sequenziamento con il kit di preparazione della libreria di RNA totale SENSE (Lexogen). Dopo la preparazione della libreria, la qualità è stata valutata su TapeStation Agilent 4200 e la concentrazione della libreria è stata determinata da Qubit ™ prima del sequenziamento (paired-end 100 bp) su HiSeq2000. Sono stati ottenuti due file per campione, divisi in letture sinistra e destra e le sequenze

dell'adattatore Lexogen (le prime 12 basi di tutte le letture) sono state rimosse utilizzando Trimmomatic [59] (v.0.33). La qualità dei dati di sequenziamento è stata verificata utilizzando FastQC [60](v.0.10.1) prima e dopo la rifilatura. Per i campioni cardiaci, nessun campione è stato scartato a causa della scarsa qualità. Due campioni sono stati scartati a causa del basso numero di letture (UNTR_002_3 e UNTR_240_3) e l'analisi dei componenti principali (Figura 1 supplementare) ha rivelato 4 valori anomali che sono stati rimossi (UNTR_008_3, UNTR_168_2, UNTR_240_2 e DMSO_336_2). Infine, poiché è rimasta solo una replica di 240 ore di campioni non trattati, tutti i campioni di questo punto temporale sono stati rimossi dall'analisi statistica. Per i campioni epatici, nessun campione è stato scartato.

Analisi dei dati dell'RNA

I conteggi delle letture per i geni sono stati ottenuti allineando le letture al genoma di riferimento (Genome Reference Consortium Human Build 38, GRCh38.p7) utilizzando RSEM [61] (v.1.2.28) con il paired-end e Bowtie2 [62] (v.2.2.6) opzione. Successivamente, i conteggi letti per ciascun gene sono stati utilizzati per la determinazione di geni differenzialmente espressi utilizzando il pacchetto DESeq2 [63] R (v.1.16.1). Qui, il design è stato impostato in base all'esposizione (UNTR o DMSO), le altre impostazioni sono state mantenute sui parametri predefiniti, ad eccezione del conteggio minimo, che è stato impostato su un conteggio medio di lettura di uno su tutti i campioni. Infine, i geni ribosomiali rimanenti sono stati filtrati dal set di dati per garantire il completo esaurimento ribosomiale dei dati.

Preparazione del campione di sequenziamento del MiRNA

Un'aliquota dell'RNA totale isolato è stata selezionata in base alla dimensione e ligata utilizzando il TruSeq Small RNA Library Prep Kit (Illumina®). Dopo la preparazione della libreria, i campioni sono stati sequenziati (paired-end 100 bp) su HiSeq2000. Le sequenze dell'adattatore sono state tagliate di [64] e le letture comprese tra 16 e 35 bp sono state mantenute per l'analisi. Tre campioni sono stati scartati a causa del basso numero di letture (cardiaco: UNTR_168_1, UNTR_168_2 ed epatico: DMSO_002_3). Inoltre, l'analisi delle componenti principali (Figura 1 supplementare) non ha rivelato valori anomali.

Analisi dei dati MiRNA

L'analisi dei dati di MiRNA è stata eseguita in modo simile come descritto in precedenza [65] , ad eccezione dell'uso di mirDeep2, che non ottiene informazioni aggiuntive quando si utilizzano campioni umani. In breve, PatMaN [66] (v.1.2.2) è stato utilizzato per allineare le letture tagliate al genoma umano senza consentire discrepanze o lacune. Per ottenere conteggi di lettura completi per le specie di miRNA 3' e 5', l'output della mappatura è stato analizzato.

proteomica

Anche i dati di proteomica sono stati ottenuti e analizzati. I metodi ei risultati sono inclusi nei dati supplementari.

Sequenziamento MeDIP

Per la preparazione delle librerie MeDIP-Seq, il protocollo MeDIP [67] a basso input è stato modificato. Il DNA è stato frammentato a 100-200 bp utilizzando il sistema Covaris S2. A causa della minore resa del DNA per i campioni cardiaci di DMSO allo 0,1%, i triplicati sono stati raggruppati prima della frammentazione. La riparazione finale e l'accodamento sono stati eseguiti utilizzando il kit di preparazione della libreria NEBNext® Ultra ™ per Illumina® (NEB), gli adattatori sono stati legati con NEBNext® Ultra ™Il modulo di ligazione (NEB) e i campioni sono stati purificati utilizzando perline Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter). I frammenti metilati sono stati catturati utilizzando il kit MagMeDIP (Diagenode). In breve, il DNA denaturato è stato miscelato con l'anticorpo anti-5-meC e catturato utilizzando sfere magnetiche. L'efficienza di acquisizione è stata determinata mediante qPCR contro frammenti di Lambda-DNA addizionati in campioni di libreria di precattura e post-acquisizione. Le librerie sono state amplificate in una fase finale della PCR utilizzando primer TruSeq con codice a barre. La qualità è stata valutata su Agilent Bioanalyzer 2100 e la concentrazione della libreria è stata determinata mediante Qubit ™ e qPCR.

Analisi dei dati MeDIP

Al fine di ottenere una copertura completa dell'intero genoma, i campioni triplicati che sono stati sequenziati individualmente sono stati uniti prima dell'allineamento. Le

letture del sequenziamento MeDIP sono state allineate al genoma di riferimento GRCh38 utilizzando bwa versione 0.7.15-r1140 [68] e analizzate in 250 finestre di base utilizzando il pacchetto R/bioconduttore QSEA [69] (v.1.4.0) con parametri standard. All'interno di QSEA, l'arricchimento MeDIP è stato calibrato con misurazioni dell'array di metilazione 450k di epatociti primari (GSM999339) e miociti cardiaci (HCM, GSM999381) da ENCODE [70] , rispettivamente per i micro tessuti epatici e cardiaci. A tal fine sono stati calcolati i valori beta dei campioni di calibrazione con il pacchetto R/bioconduttore Minfi [71](v.1.24.0), le posizioni genomiche delle sonde dell'array sono state mappate da GRCh37 a GRCh38 utilizzando lo strumento a riga di comando UCSC liftOver [72] e si è calcolata la media delle sonde all'interno di 250 finestre di base. Le regioni metilate differenzialmente ottenute da QSEA sono state annotate con informazioni su gene, esone e promotore (sito di inizio della trascrizione +/- 2 kilobasi) da RefSeq, ENCODE TFBS e isole CpG basate su modello, tutte ottenute tramite il browser della tabella UCSC. Poiché ENCODE TFBS non era disponibile per GRCh38, le posizioni genomiche sono state mappate da GRCh37 utilizzando lo strumento liftOver.

Disponibilità dei dati

I set di dati generati e analizzati durante il presente studio sono disponibili nel database BioStudies (http://www.ebi.ac.uk/biostudies) con i numeri di accesso S-HECA1, S-HECA5, S-HECA9, S-HECA18, S -HECA33, S-HECA34, S-HECA47, S-HECA139, S-HECA158, S-HECA361, S-HECA401, S-HECA403.

Riferimenti

1. Galvao, J. *et al* . Tossicità inaspettata a basse dosi del solvente universale DMSO. *Faseb J* **28** , 1317–1330, https://doi.org/10.1096/fj.13-235440 (2014).

2. Sumida, K. *et al* . Effetti del DMSO sull'espressione genica negli epatociti umani e

di ratto. *Hum Exp Toxicol* **30** , 1701–1709, https://doi.org/10.1177/0960327111399325 (2011).

3. Yuan, Y. *et al* . Efficiente crioconservazione a lungo termine di cellule staminali pluripotenti a-80 gradi C. *Sci Rep-Uk* **6** , doi:ARTN 34476 10.1038/srep34476 (2016).

4. FDA. http://www.accessdata.fda.gov/cms_ia/importalert_169.html .

5. Brobyn, RD La tossicologia umana del dimetilsolfossido. *Ann NY Accad Sci* **243** , 497–506 (1975).

6. Rubin, LF Aggiornamento tossicologico del dimetilsolfossido. *Ann NY Accad Sci* **411** , 6–10 (1983).

7. Smith, ER, Hadidian, Z. & Mason, MM La tossicità a dose singola e ripetuta del dimetilsolfossido. *Ann NY Accad Sci* **141** , 96–109 (1967).

8. FDA. www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm073395.pdf (2012).

9. Jacob, SW & Herschler, R. Farmacologia di DMSO. *Criobiologia* **23** , 14–27 (1986).

10. Edgar, DH & Gook, DA Una valutazione critica della crioconservazione (raffreddamento lento rispetto alla vetrificazione) di ovociti ed embrioni umani. *Hum Reprod Aggiornamento* **18** , 536–554, https://doi.org/10.1093/humupd/dms016 (2012).

11. Denko, CW, Goodman, RM, Miller, R. & Donovan, T. Distribuzione di

dimetilsolfossido-35S nel ratto. *Ann NY Accad Sci* **141** , 77–84 (1967).

12. Yu, ZW & Quinn, PJ Dimetilsolfossido: una rassegna delle sue applicazioni nella biologia cellulare. *Biosci Rep* . **14** , 259–281 (1994).

13. Deng, ZH *et al* . Terapia topica con diclofenac per l'osteoartrite: una meta-analisi di studi randomizzati controllati. *Clin Reumatolo* **35** , 1253–1261, https://doi.org/10.1007/s10067-015-3021-z (2016).

14. Fuller, P. & Roth, S. Diclofenac soluzione topica di sodio con dimetilsolfossido, una valida alternativa agli antinfiammatori non steroidei orali nell'osteoartrite: revisione delle prove attuali. *J Multidiscip Healthc* **4** , 223–231, https://doi.org/10.2147/JMDH.S23209 (2011).

15. Kamburov, A. *et al* . ConsensusPathDB: verso un quadro più completo della biologia cellulare. *Acidi nucleici Res* **39** , D712–D717, https://doi.org/10.1093/nar/gkq1156 (2011).

16. Fabregat, A. *et al* . La base di conoscenza del percorso Reactome. *Acidi nucleici Res* **44** , D481–D487, https://doi.org/10.1093/nar/gkv1351 (2016).

17. Lederkremer, ripiegamento della glicoproteina GZ, controllo di qualità e degradazione associata a ER. *Curr Opin Struc* . *Biol* **19** , 515–523, https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.06.004 (2009).

18. Chou, CH *et al* . miRTarBase 2016: aggiornamenti al database delle interazioni miRNA-target validato sperimentalmente. *Acidi nucleici Res* **44** , D239–247, https://doi.org/10.1093/nar/gkv1258 (2016).

19. Iwatani, M. *et al* . Il dimetilsolfossido ha un impatto sul profilo epigenetico nel

corpo dell'embrione di topo. *Cellule staminali* **24** , 2549–2556, https://doi.org/10.1634/stemcells.2005-0427 (2006).

20. Nunes, SS, Miklas, JW & Radisic, M. Maturazione del tessuto cardiaco umano derivato da cellule staminali imitando la frequenza cardiaca fetale. *Future Cardiol* **9** , 751–754, https://doi.org/10.2217/fca.13.71 (2013).

21. Batalov, I. & Feinberg, AW Differenziazione di cardiomiociti da cellule staminali pluripotenti umane mediante coltura monostrato. *Biomark Insights* **10** , 71–76 (2015).

22. Robertson, C., Tran, DD & George, SC Revisione concisa: fasi di maturazione dei cardiomiociti umani derivati da cellule staminali pluripotenti. *Cellule staminali* **31** , 829–837, https://doi.org/10.1002/stem.1331 (2013).

23. Eberhardt, MK & Colina, R. La reazione dei radicali OH con dimetilsolfossido. Uno studio comparativo del reagente di Fenton e della radiolisi di soluzioni acquose di dimetilsolfossido. *The Journal of Organic Chemistry* **53** , 1071–1074 (1988).

24. Zorov, DB, Juhaszova, M. & Sollott, SJ Specie reattive dell'ossigeno mitocondriale (ROS) e rilascio di ROS indotto da ROS. *Physiol Rev* **94** , 909–950, https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2013 (2014).

25. Lane, M. & Gardner, DK Comprensione delle interruzioni cellulari durante lo sviluppo iniziale dell'embrione che perturbano la vitalità e lo sviluppo fetale. *Reprod Fert Develop* **17** , 371–378, https://doi.org/10.1071/Rd04102 (2005).

26. Benkhalifa, M. *et al* . Mitocondri: Partecipazione all'infertilità come fonte di energia e causa di senescenza. *Int J Biochimica* . *Cella B* **55** , 60–64, https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.08.011 (2014).

27. Kang, MH *et al* . Gli effetti citotossici del dimetilsolfossido negli embrioni preimpianto di topo: uno studio meccanicistico. *Teranostici* **7** , 4735–4752, https://doi.org/10.7150/thno.21662 (2017).

28. Haider, S. *et al* . Il panorama degli elementi ripetuti del DNA nell'insufficienza cardiaca umana. *Genoma Biol* . **13** , doi:ARTN R90 10.1186/gb-2012-13-10-R90 (2012).

29. Yokochi, T. & Robertson, KD Il dimetilsolfossido stimola l'attività catalitica della de novo DNA metiltransferasi 3a (Dnmt3a) *in vitro* . *Bioorg Chem* **32** , 234–243, https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2004.04.005 (2004).

30. Thaler, R., Spitzer, S., Karlic, H., Klaushofer, K. & Varga, F. DMSO è un forte induttore dell'idrossimetilazione del DNA nelle cellule MC3T3-E1 pre-osteoblastiche. *Epigenetica-Us* **7** , 635–651, https://doi.org/10.4161/epi.20163 (2012).

31. Kawai, K., Li, YS, Song, MF e Kasai, H. metilazione del DNA da parte di dimetilsolfossido e metionina solfossido innescata dal radicale idrossile e implicazioni per le modifiche epigenetiche. *Bioorg Med Chem Lett* **20** , 260–265, https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.10.124 (2010).

32. Nishant, KT, Singh, ND e Alani, E. Tassi di mutazione genomica: cosa possono dirci i metodi ad alto rendimento. *Biosaggi* **31** , 912–920, https://doi.org/10.1002/bies.200900017 (2009).

33. Stinshoff, H., Wilkening, S., Hanstedt, A., Bollwein, H. & Wrenzycki, C. Il dimetilsolfossido e gli acidi linoleici coniugati influenzano lo sviluppo dell'embrione bovino *in vitro* . *Reprod Fert Develop* **26** , 502–510, https://doi.org/10.1071/Rd12372 (2014).

34. Azari, M., Kafi, M., Ebrahimi, B., Fatehi, R. & Jamalzadeh, M. Maturazione degli ovociti, sviluppo dell'embrione ed espressione genica seguendo due diversi metodi di vetrificazione dei complessi cumulo-ovociti bovini. *Vet Res Commun* **41** , 49–56, https://doi.org/10.1007/s11259-016-9671-8 (2017).

35. Li, X., Wang, YK, Song, ZQ, Du, ZQ e Yang, CX Dimetilsolfossido perturba la progressione del ciclo cellulare e l'organizzazione del fuso negli ovociti meiotici suini. *Plos One* **11** , https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158074 (2016).

36. Zhou, DJ *et al* . Effetti del dimetilsolfossido sulla divisione asimmetrica e sulla citochinesi negli ovociti di topo. *Bmc Dev Biol* **14** , https://doi.org/10.1186/1471-213x-14-28 (2014).

37. Xu, QH e Xie, W. Epigenoma nello sviluppo dei primi mammiferi: ereditarietà, riprogrammazione e insediamento. *Trends Cell Biol* **28** , 237–253, https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.10.008 (2018).

38. Heijmans, BT *et al* . Differenze epigenetiche persistenti associate all'esposizione prenatale alla carestia negli esseri umani. *P Natl Acad Sci USA* **105** , 17046–17049, https://doi.org/10.1073/pnas.0806560105 (2008).

39. Tobi, EW *et al* . Le differenze di metilazione del DNA dopo l'esposizione alla carestia prenatale sono comuni e specifiche per tempi e sesso. *Hum Mol Genet* **18** , 4046–4053, https://doi.org/10.1093/hmg/ddp353 (2009).

40. Veenendaal, MVE *et al* . Effetti transgenerazionali dell'esposizione prenatale alla carestia olandese del 1944-45. *Bjog-Int J Obstet Gy* **120** , 548–554, https://doi.org/10.1111/1471-0528.12136 (2013).

41. De Rycke, M., Liebaers, I. & Van Steirteghem, A. Rischi epigenetici relativi alle

tecnologie di riproduzione assistita - Analisi del rischio ed eredità epigenetica. *Hum Reprod* **17** , 2487–2494, https://doi.org/10.1093/humrep/17.10.2487 (2002).

42. Hart, R. & Norman, RJ Gli esiti di salute a lungo termine per i bambini nati a seguito di un trattamento di fecondazione in vitro: Parte I Risultati di salute generali. *Hum Reprod Aggiornamento* **19** , 232–243, https://doi.org/10.1093/humupd/dms062 (2013).

43. Hansen, M., Bower, C., Milne, E., de Klerk, N. & Kurinczuk, JJ Tecnologie di riproduzione assistita e rischio di difetti alla nascita: una revisione sistematica. *Hum Reprod* **20** , 328–338, https://doi.org/10.1093/humrep/deh593 (2005).

44. Bower, C. & Hansen, M. Tecnologie di riproduzione assistita e risultati alla nascita: panoramica delle recenti revisioni sistematiche. *Reprod Fert Develop* **17** , 329–333, https://doi.org/10.1071/Rd04095 (2005).

45. Pelkonen, S. *et al* . Salute fisica dei bambini singleton nati dopo il trasferimento di embrioni congelati mediante congelamento lento: uno studio di follow-up di 3 anni. *Hum Reprod* **30** , 2411–2418, https://doi.org/10.1093/humrep/dev203 (2015).

46. Maher, ER, Afnan, M. & Barratt, CL Rischi epigenetici legati alle tecnologie di riproduzione assistita: epigenetica, imprinting, ART e iceberg? *Hum Reprod* **18** , 2508–2511, https://doi.org/10.1093/humrep/deg486 (2003).

47. Laprise, SL Implicazioni dell'epigenetica e dell'imprinting genomico nelle tecnologie di riproduzione assistita. *Mol Reprod Dev* **76** , 1006–1018, https://doi.org/10.1002/mrd.21058 (2009).

48. Manipalviratn, S., DeCherney, A. & Segars, J. Disturbi dell'imprinting e tecnologia

di riproduzione assistita. *Fertil Steril* **91** , 305–315, https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.01.002 (2009).

49. Thompson, JG, Kind, KL, Roberts, CT, Robertson, SA & Robinson, JS Rischi epigenetici legati alle tecnologie di riproduzione assistita - Conseguenze a breve e lungo termine per la salute dei bambini concepiti attraverso la tecnologia di riproduzione assistita: motivo in più di cautela? *Hum Reprod* **17** , 2783–2786, https://doi.org/10.1093/humrep/17.11.2783 (2002).

50. Uyar, A. & Seli, E. L'impatto delle tecnologie di riproduzione assistita sull'imprinting genomico e sui disturbi dell'imprinting. *Curr Opin Obstet Gyn* **26** , 210–221, https://doi.org/10.1097/Gco.0000000000000071 (2014).

51. Barnhart, KT Introduzione: Siamo pronti ad eliminare il trasferimento di embrioni freschi *nella fecondazione in vitro* ? *Fertil Steril* **102** , 1–2, https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.05.024 (2014).

52. Chen, ZJ *et al* . Embrioni freschi contro congelati per l'infertilità nella sindrome dell'ovaio policistico. *Nuovo inglese J Med* **375** , 523–533, https://doi.org/10.1056/NEJMoa1513873 (2016).

53. Vuong, LN *et al* . Trasferimento IVF di embrioni freschi o congelati in donne senza ovaie policistiche. *Nuovo inglese J Med* **378** , 137–147, https://doi.org/10.1056/NEJMoa1703768 (2018).

54. Petropanagos, A. In *Oncofertility* 223–235 (Springer, 2010).

55. Gardner, DK e Kelley, RL Impatto dell'ambiente di laboratorio della fecondazione in vitro sul fenotipo dell'embrione preimpianto umano. *J Dev Orig Hlth Dis* **8** , 418–435, https://doi.org/10.1017/S2040174417000368 (2017).

56. Westphal, JR, Gerritse, R., Braat, DDM, Beerendonk, CCM & Peek, R. Protezione completa contro il criodanneggiamento di ovaie umane e bovine intere crioconservate utilizzando DMSO come crioprotettore. *J Riproduzione assistita . Gen* **34** , 1217–1229, https://doi.org/10.1007/s10815-017-0963-x (2017).

57. De Munck, N., Vajta, G. & Rienzi, L. Nella *prevenzione della perdita di fertilità legata all'età* 87–101 (Springer, 2018).

58. Kuepfer, L. *et al* . Un disegno di analisi basato su modello per riprodurre modelli *in vivo* di tossicità acuta indotta da farmaci. *Arch Toxicol* , 1–3 (2017).

59. Bolger, AM, Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: un trimmer flessibile per i dati di sequenza Illumina. *Bioinformatica* **30** , 2114–2120, https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170 (2014).

60. Andrews, S. *FastQC: uno strumento di controllo qualità per dati di sequenza ad alta velocità* . http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc (2010).

61. Li, B. & Dewey, CN RSEM: quantificazione accurata del trascritto dai dati RNA-Seq con o senza un genoma di riferimento. *Bmc Bioinformatica* **12** , https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323 (2011).

62. Langmead, B. & Salzberg, SL Allineamento rapido con lettura sbilanciata con Bowtie 2. *Metodi Nat* **9** , 357–U354, https://doi.org/10.1038/Nmeth.1923 (2012).

63. Love, MI, Huber, W. & Anders, S. Stima moderata del cambiamento di piega e della dispersione per i dati RNA-seq con DESeq2. *Genoma Biol* **15** , https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8 (2014).

64. Azioni, MB *et al* . L'ambiente di lavoro UEA sRNA: una suite di strumenti per

l'analisi e la visualizzazione di microRNA di sequenziamento di nuova generazione e set di dati di piccoli RNA. *Bioinformatica* **28** , 2059–2061, https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts311 (2012).

65. Caiment, F., Gaj, S., Claessen, S. & Kleinjans, J. L'integrazione di dati ad alto rendimento di RNA-miRNA-circRNA rivela nuove intuizioni sui meccanismi di cancerogenicità indotta da benzo[a]pirene. *Acidi nucleici Res* **43** , 2525–2534, https://doi.org/10.1093/nar/gkv115 (2015).

66. Prufer, K. *et al* . PatMaN: allineamento rapido di brevi sequenze a database di grandi dimensioni. *Bioinformatica* **24** , 1530–1531, https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn223 (2008).

67. Taiwo, O. *et al* . Analisi del metiloma utilizzando MeDIP-seq con basse concentrazioni di DNA. *Protocolli sulla natura* **7** , 617 (2012).

68. Li, H. & Durbin, R. Allineamento a lettura lunga veloce e accurato con la trasformata di Burrows-Wheeler. *Bioinformatica* **26** , 589–595, https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp698 (2010).

69. Lienhard, M. *et al* . Modellazione QSEA della metilazione del DNA dell'intero genoma da esperimenti di arricchimento di sequenziamento. *Acidi nucleici Res* **45** , e44, https://doi.org/10.1093/nar/gkw1193 (2017).

70. Consortium, EP Un'enciclopedia integrata degli elementi del DNA nel genoma umano. *Natura* **489** , 57–74, https://doi.org/10.1038/nature11247 (2012).

71. Arye, MJ *et al* . Minfi: un pacchetto bioconduttore flessibile e completo per l'analisi di microarray di metilazione del DNA di Infinium. *Bioinformatica* **30** , 1363–1369, https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu049 (2014).

72. Hinrichs, AS *et al* . Il database del browser del genoma dell'UCSC: aggiornamento 2006. *Acidi nucleici Res* . **34** , D590–598, 10.1093/nar/gkj144 (2006).

Ringraziamenti

La ricerca in corso è stata finanziata dal Settimo programma quadro dell'Unione europea HeCaToS (FP7/2007-2013) nell'ambito della convenzione di sovvenzione n. 602156.

Informazioni sull'autore

Affiliazioni

Tossicogenomica, Università di Maastricht, Maastricht, Paesi Bassi
M. Verheijen, Y. Schrooders, J. Kleinjans e F. Caiment

Biologia molecolare computazionale, Max-Planck-Institute for Molecular Genetics, Berlino, Germania
M. Lienhard, S. Boerno, B. Timmermann & R. Herwig

F. Hoffmann-La Roche AG, Basilea, Svizzera
O. Clayton e R. Nudischer

Centro di genomica funzionale di Zurigo, ETH Zurigo e Università di Zurigo, Zurigo, Svizzera
N. Selevsek & R. Schlapbach

Genedata AG, Basilea, Svizzera
H. Gmuender e S. Gotta

Genetica e biologia cellulare, Università di Maastricht, Medical Center, Maastricht, Paesi Bassi
J.Geraedts

Contributi

OC e RN hanno effettuato le esposizioni dei microtessuti. YS e MV hanno eseguito il sequenziamento dell'RNA. SB e BT hanno eseguito MeDIP-seq. NS e RS hanno eseguito misurazioni di proteomica. HG e SG hanno analizzato il proteoma. MV ha analizzato il proteoma e ha eseguito l'interpretazione biologica del proteoma e del trascrittoma, sotto la supervisione di FC e JKML ha eseguito l'interpretazione biologica dell'epigenoma, sotto la supervisione di RHMV ha preso l'iniziativa nella scrittura del

manoscritto e nella progettazione delle figure, con il contributo di MLJG ha esaminato criticamente il manoscritto.

autore corrispondente

Corrispondenza a F. Caiment .

Dichiarazioni etiche

Interessi conflittuali

Gli autori non dichiarano interessi concorrenti.

Informazioni aggiuntive

Nota dell'editore: Springer Nature rimane neutrale per quanto riguarda le rivendicazioni giurisdizionali nelle mappe pubblicate e le affiliazioni istituzionali.

Informazione supplementare

Informazione supplementare

Diritti e permessi

Accesso aperto Questo articolo è concesso in licenza in base a una licenza internazionale Creative Commons Attribution 4.0, che consente l'uso, la condivisione, l'adattamento, la distribuzione e la riproduzione in qualsiasi mezzo o formato, purché si attribuisca un credito appropriato all'autore originale e alla fonte, fornire un collegamento alla licenza Creative Commons e indicare se sono state apportate modifiche. Le immagini o altro materiale di terze parti in questo articolo sono inclusi

nella licenza Creative Commons dell'articolo, se non diversamente indicato in una linea di credito al materiale. Se il materiale non è incluso nella licenza Creative Commons dell'articolo e l'uso previsto non è consentito dalla normativa legale o supera l'uso consentito, sarà necessario ottenere l'autorizzazione direttamente dal titolare del copyright. Per visualizzare una copia di questa licenza, visitarehttp://creativecommons.org/licenses/by/4.0/ .

Ristampe e autorizzazioni

A proposito di questo articolo

Cita questo articolo

Verheijen, M., Lienhard, M., Schrooders, Y. *et al.* Il DMSO induce cambiamenti drastici nei processi cellulari umani e nel panorama epigenetico *in vitro* . *Rappresentazione scientifica* **9,** 4641 (2019). https://doi.org/10.1038/s41598-019-40660-0

Ricevuto	Accettato	Pubblicato
22 agosto 2018	20 febbraio 2019	15 marzo 2019

DOI

https://doi.org/10.1038/s41598-019-40660-0

Condividi questo articolo

Chiunque condivida il seguente link potrà leggere questo contenuto:

Ottieni link condivisibile

Fornito dall'iniziativa di condivisione dei contenuti Springer Nature SharedIt

Soggetti

Metilazione del DNA • Espressione genica • Silenziamento genico • proteomica • Tossicologia

Ulteriori letture

Il trattamento con DMSO a basse dosi induce l'oligomerizzazione e accelera l'aggregazione dell'α-sinucleina

Lasse Reimer , Caroline Haikal ... Poul Henning Jensen

Rapporti scientifici (2022)

Avvertimento fluoroforo: una guida per addetti ai lavori alle etichette fluorescenti di piccole molecole

Jonathan B. Grimm & Luke D. Lavis

Metodi della natura (2022)

Recenti progressi nei microaghi porosi: materiali, fabbricazione e applicazioni transdermiche

Leilei Bao , Parco Jongho ... Beomjoon Kim

Drug Delivery e ricerca traslazionale (2022)

Rivisitazione del flubendazolo attraverso la tecnologia dei nanocristalli: progettazione statistica, caratterizzazione e suo potenziale effetto inibitorio sulla progressione del tumore polmonare xenotrapianto nei topi

Debora de Souza Gonçalves , Megumi Nishitani Yukuyama ... Gabriel Lima Barros de Araujo

Journal of Cluster Science (2022)

L'effetto di diversi protocolli di vetrificazione sulla sopravvivenza cellulare nel tessuto ovarico umano: uno studio pilota

J. Marschalek , C. Egarter ... D. Pietrowski

Journal of Ovarian Research (2021)

Rapporti scientifici (*Rep. Sci*) | ISSN 2045-2322 (in linea)

© 2022 Springer Nature Limited